第 44 卷 第 1 期
2001 年 2 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44, No.1
Feb., 2001

褐飞虱体内保幼激素滴度变化及其与翅型分化的关系

戴华国，吴晓毅*，武淑文
（南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

摘要：用高压液相色谱及放射化学法，分别测定了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 1～5 龄若虫体内的保幼激素滴度与保幼激素酯酶活性变化，并用保幼激素类似物（ZR-515）进行体表点滴加以验证。结果表明，褐飞虱雌、雄 4 龄若虫期及雄虫的 5 龄若虫初期，短、长翅型间体内保幼激素滴度差异明显，可以认为该阶段是其翅型分化的关键时期。

关键词：褐飞虱；翅型分化；保幼激素滴度
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2001）01-0027-06

关于远距离迁飞害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的翅型分化，有关研究者曾先后作过报道[1]，揭示了水稻生育期、植株营养条件、温度、光照长度及若虫栖息密度等环境因素对褐飞虱翅型分化的影响。多数研究者推测，环境因素是通过对褐飞虱体内保幼激素滴度（JH titer）的影响来调控其翅型分化的[1]。由于试验条件不同，且未对若虫体内 JH 滴度与翅型分化的关系进行深入研究，故对于褐飞虱翅型分化的敏感龄期众说纷纭，1～5 龄若虫期均有报道。Iwanaga 和 Tojo 对 JH 与褐飞虱翅型分化及卵巢发育的关系进行了专门研究，并通过褐飞虱若虫体背点滴 JH 类似物（methoprene），确定其翅型分化的敏感龄期为 3 龄末 4 龄初期[2]。但由于未对若虫期体内 JH 滴度进行全面的测定，部分结论尚缺乏实验依据。

本项研究通过高压液相色谱（HPLC）对褐飞虱 1～5 龄若虫体内 JH 滴度进行全面测定，并通过放射化学（RC）法测定其保幼激素酯酶（JHE）活性加以验证，通过若虫体背点滴保幼激素类似物（ZR-515）检测实验结果，为确定褐飞虱若虫翅型分化的关键时期提供了较为充足的论据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试水稻品种：汕优 63；供试昆虫：虫源采自广西南宁，网室饲养，自然繁殖。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39470483）
* 现在江苏省农林厅植保站工作
收稿日期：1998-10-27；接受日期：1999-06-02

1.2 实验方法

1.2.1 短、长翅型若虫试样的来源：在室内（27±1)℃，14L:10D条件下，将分蘖期水稻插入直径30 mm，长200 mm的试管内，加入少量木村营养液，而后向试管中接入短翅型后代初孵若虫，每管内若虫密度5～10头。每隔3天更换试管中的稻苗和营养液，并向试管中加入适量同龄若虫，以保持密度，得短翅型虫样。在室内（32±1)℃，16L:8D条件下，以抽穗黄熟期水稻，每管25头以上密度饲养长翅型后代初孵若虫，得长翅型虫样。上述条件下饲养所得的短翅型雌虫比率在90%以上，短翅型雄虫比率在95%以上；长翅型雌虫比率在85%以上，长翅型雄虫比率在95%以上。

1.2.2 取样方法：1～3龄若虫，每龄期间隔12 h取样1次；4～5龄若虫，每龄期区分雌雄，间隔12 h取样1次。虫样置于−30℃下冷冻保存。

1.2.3 若虫体内保幼激素滴度及保幼激素酯酶活性的测定：用高压液相色谱测定若虫体内的JH滴度[3]：一定量若虫加入提取液（甲醇:乙醚=1:1）研磨匀浆，CSF-1A型超声发生器振荡破碎，再加入正己烷超声振荡后，4 000 r/min离心10 min后取上清液。用正己烷反复提取5次后汇总上清液，测定前用高纯N_2吹干，流动相（甲醇:水=75:25）定容。测定使用美国Water 5108型液相色谱仪，UV481型可调波长可见-紫外检测器，LKB 2210型记录仪。色谱条件为：Spher C_{18}柱（中国科学院大连化学物理研究所），ID 45 μm，4.6 mm×150 mm；流动相流速0.6 mL/min；紫外检测λ=218 nm，0.05 AUFS；进样量10 μL，以峰高定量。所用试剂：JHⅢ标样为美国Behring Diagnostics产品。甲醇、正乙烷、乙醚均为国产分析纯试剂，经重蒸后使用。

用放射化学法测定若虫体内JHE的活性[4]：用pH7.0的0.1 mol/L的磷酸缓冲液进行若虫体冰浴匀浆，超声波破碎，经静置过夜，离心制备酶液。将待测酶液加入稀释后的^{3}H-JHⅢ标样溶液中，经（31±1)℃温浴后用碱性甲醇溶液中止反应；涡旋振荡后加入异辛烷振荡萃取10 min，4 000 r/min离心10 min。吸取上清液和下层液各50μL置于闪烁瓶中，加入5 mL亲水型闪烁液，由Beckman LS-9800型液体闪烁计数器用H数法校准测定放射性活度。所用试剂：^{3}H-JHⅢ（^{10}C）由美国杜邦原子能研究所标记合成（中国科学院动物研究所提供），放射性比活度为444.0 GBq/mmol，异辛烷稀释后使用；异辛烷为国产分析纯试剂，磷酸缓冲液、碱性甲醇、亲水型闪烁液（PPO 5 g，POPOP 0.5 g，二甲苯665 mL，Triton-100 335 mL），均由国产分析纯试剂配制。

1.2.4 保幼激素类似物对若虫翅型分化的诱导：将ZR-515（中国科学院动物研究所提供）用丙酮（国产分析纯）稀释至1 000 pg/μL，用微量滴管快速点滴于经CO_2麻醉、置于冷板上的3～5龄若虫前胸背板上，每头点滴0.05 μL，以未点滴与点滴丙酮作为对照。记录所处理组试虫的死亡率、若虫历期、发育至成虫后雌雄性别与短长翅型个体比例。

2 结果与分析

2.1 短、长翅型褐飞虱1～2龄若虫体内JHE活性变化

短、长翅型1～2龄若虫体内JHE活性变化极为相似，不同翅型间无明显差异。图1所示为2龄若虫体内JHE活性变化动态。

从图 1 中可以看出，除龄期末外，短、长翅型若虫体内 JHE 活性变化大致相同。龄期末虽有一定差别，但差异不显著。从 1～2 龄若虫体内 JHE 活性测定的结果可以推测，短、长翅型褐飞虱 1～2 龄若虫体内 JH 滴度变化基本一致，虽然 2 龄末期长翅型若虫体内 JHE 活性略高于短翅型，以致长翅型若虫体内 JH 滴度较低于短翅型，但差异不显著，不至于对翅型分化产生影响。

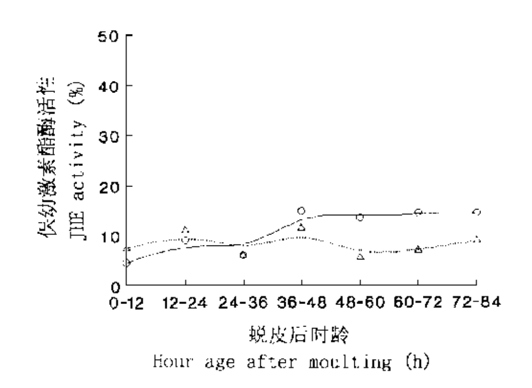


图 1　2 龄若虫保幼激素酯酶活性的变化动态

Fig. 1　The dynamics of JHE activity of 2nd instar nymph

——长翅型保幼激素酯酶活性 JHE activity of M-form

……短翅型保幼激素酯酶活性 JHE activity of B-form

图 2～图 4 同　The same for Fig. 2～Fig. 4

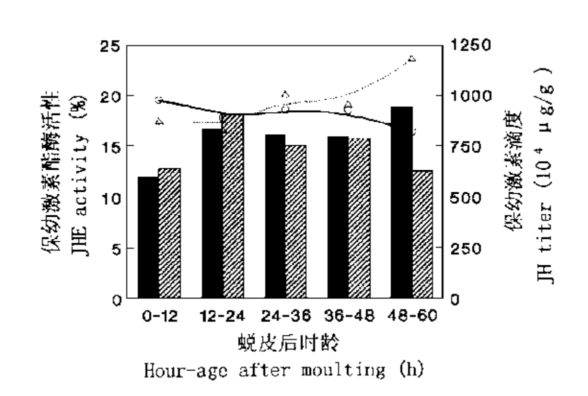


图 2　3 龄若虫保幼激素滴度与保幼激素酯酶活性的变化动态

Fig. 2　The dynamics of JH titer and JHE activity of 3rd instar nymph

■长翅型保幼激素滴度 JH titer of M-form

▨短翅型保幼激素滴度 JH titer of B-form

图 3～图 4 同　The same for Fig. 3～Fig. 4

2.2　短、长翅型褐飞虱 3 龄若虫体内 JH 滴度与 JHE 活性变化

从图 2 可以看出，短、长翅型褐飞虱 3 龄若虫体内 JH 滴度与 JHE 活性变化基本没有差别。龄期末出现的差别，可能是雌、雄虫混合取样对测定结果产生的影响，也可能是龄期末生长蜕皮导致褐飞虱短、长翅型若虫体内 JH 滴度发生不同变化之故。保幼激素类似物（ZR-515）点滴处理的结果尚未表明 3 龄若虫体内 JH 滴度变化对翅型分化产生影响，但 3 龄若虫末期体内 JH 滴度与雌、雄虫翅型分化的关系尚需进一步研究。

2.3　短、长翅型褐飞虱雌、雄 4 龄若虫体内 JH 滴度与 JHE 活性变化

4 龄若虫已能区分雌、雄性别，其雌雄若虫体内 JH 滴度与 JHE 活性变化测定结果见图 3。从图 3 可以看出，短、长翅型褐飞虱雌雄 4 龄若虫均在该龄中期体内 JH 滴度与 JHE 活性出现明显差别（0.01 水平差异显著），短翅型若虫体内 JH 滴度大大高于长翅型，而 JHE 活性则明显低于长翅型。说明 4 龄中期是褐飞虱翅型分化的关键时期，该时期如果外因对体内 JH 滴度产生不同影响的话，会导致其向短翅型或长翅型方向发展。值得注意的是，4 龄末期雌、雄性别间有一定差异：该阶段雌性若虫短翅型体内 JH 滴度已低于长翅型，而雄性若虫短翅型体内 JH 滴度仍高于长翅型，这种动态一直保持至 5 龄中期，说明雄性若虫 5 龄中期前对翅型分化还有一定影响。

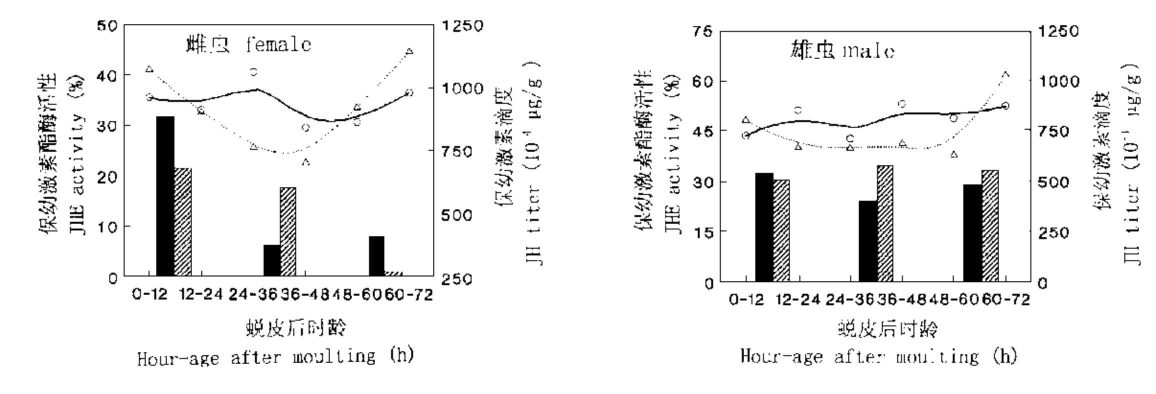


图3 4龄若虫保幼激素滴度与保幼激素酯酶活性的变化动态

Fig. 3 The dynamics of JH titer and JHE activity of 4th instar nymph

2.4 短、长翅型褐飞虱雌、雄5龄若虫体内JH滴度与JHE活性变化

图4所示：雌性5龄若虫的大部分阶段JH滴度与JHE活性在短、长翅型间差别不明显。但在龄期末，短翅型体内JH滴度远远超过长翅型，导致短翅型雌成虫性成熟比长翅型早40～50 h[5]。雄性5龄若虫的前期与中期，短翅型体内JH滴度较高而JHE活性较低，致使短翅型雄成虫性成熟较早，在羽化初期的交配竞争能力高于长翅型[5]。5龄若虫期是向成虫转化的阶段，其体内JH的作用主要为变态蜕皮准备条件，但保幼激素类似物（ZR-515）对5龄若虫点滴处理的结果表明，5龄雄性若虫的前期，体内JH滴度与翅型分化尚有一定关系。

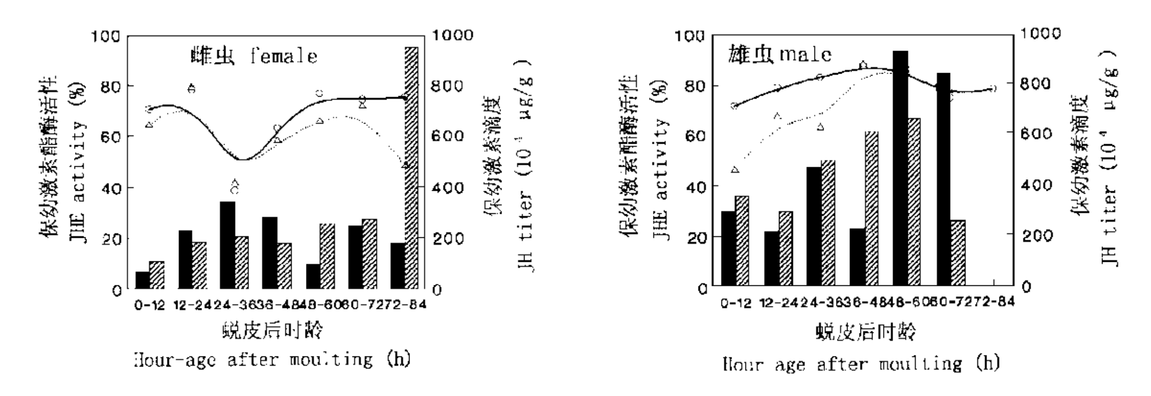


图4 5龄若虫保幼激素滴度与保幼激素酯酶活性的变化动态

Fig. 4 The dynamics of JH titer and JHE activity of 5th instar nymph

2.5 保幼激素类似物对褐飞虱3～5龄若虫翅型分化的诱导结果

保幼激素类似物ZR-515对3～5龄若虫点滴处理结果见表1。从表1诱导试验的结果可以看出，JH类似物的诱导作用在褐飞虱4龄期有一定效果，特别是4龄中期（24～48 h），无论雌、雄，促短翅化的效果均较明显；对于雄性来说，这种效果一直可以延续到5龄前期（0～24 h）。该项试验验证了上述JH滴度的测定结果，为证实褐飞虱雌、雄4龄若虫期，雄性的5龄若虫初期为其翅型分化的关键时期提供了依据。

表 1　ZR-515（50 pg/头）对 3～5 龄若虫翅型分化的诱导结果

Table 1　Effect of ZR-515 on the wing dimorphism of 3rd～5th instar nymphs

龄期 Instar	类型 Type	时龄(h) Hour age	处理虫数① （头）	羽化后各翅型成虫数②（头）				短翅率③（%）		实验中死亡虫数④（头）
				长♂⑤	长♀	短♂⑥	短♀	♂	♀	
3 龄 3rd	未点滴⑦	（24～48）	100	16	2	30	48	65.2	96.0	4
	丙酮⑧	（24～48）	116	16	4	34	46	68.0	92.0	16
	处理⑨	0～24	132	17	7	33	53	66.0	88.3	22
		24～48	136	18	4	34	56	67.3	93.3	24
		48～72	125	18	4	34	51	65.3	92.7	18
4 龄 4th	未点滴⑦	（24～48）	158	28	25	32	57	53.3	69.5	16
	丙酮⑧	（24～48）	140	27	32	31	46	53.4	59.0	4
	处理⑨	0～24	174	30	28	42	67	58.3	70.5	7
		24～48	200	13	12	64	88	83.1	88.0	23
		48～72	180	31	19	48	61	60.8	76.2	21
5 龄 5th	未点滴⑦	（24～48）	150	50	19	15	53	23.1	73.6	13
	丙酮⑧	（24～48）	150	47	18	17	48	26.6	72.7	20
	处理⑨	0～24	150	28	24	32	41	53.3	63.1	25
		24～48	150	41	23	22	42	34.9	64.6	22
		48～72	150	39	18	19	50	32.8	73.5	24

①number of nymphs tested；②number of adults after emergence；③B-form rate；④mortality in experiment；⑤M-form；⑥B-form；⑦no dropping；⑧acetone；⑨treatment

3　讨论

JH 作为一种重要的发育调控激素，在昆虫个体发育的某一特定时期，滴度的高低决定该个体选择何种发育途径以产生相应的变态，在翅多型现象中，JH 有促短翅化或无翅化的倾向[6]。褐飞虱若虫体内 JH 滴度的检测结果与 JH 类似物诱导试验的结果表明，褐飞虱雌、雄 4 龄若虫期（特别是 4 龄中期），雄性 5 龄若虫初期，短、长翅型间 JH 滴度出现较大的差别，且诱导成功率很高，可以认为上述时期是其翅型分化的关键时期。以往的研究基于控制环境因子进行有关试验观察，但鉴于环境条件难以控制完善，而褐飞虱体内 JH 滴度又受环境影响较大，故实验结果不一，也不具备较强的说服力。本项研究通过褐飞虱各龄若虫体内 JH 滴度的测定，揭示了其体内 JH 滴度的变化动态，并辅以诱导试验，从内因方面为阐明其翅型分化的敏感龄期提供了论据。

褐飞虱体内 JH 滴度采用 HPLC 直接测定以及用 RC 法测定 JHE 活性来表示，测定结果表明，JH 滴度 与 JHE 活性变化呈较明显的负相关关系。HPLC 测定需要较多数量的虫体，且受杂质影响较大，而 JHE 活性测定需要虫体数量较少，测定结果也较为准确，故主要依据 JHE 的活性变化来进行结果分析。鉴于褐飞虱1、2 龄若虫虫体很小，难以满足 HPLC 测定取样的要求，故 1、2 龄若虫主要进行体内 JHE 的活性测定。

Iwanaga 等进行点滴试验使用的 JH 类似物（methoprene）浓度为 10 pg/头，本项试验中 10 pg/头浓度基本无效，经过测定，以 50 pg/头效果明显，这可能与使用试剂的含量与纯度有关。由于工作量较大，点滴试验分两年完成。鉴于褐飞虱世代间短翅率差异较大，故对照的短翅率不尽相同，但这并不影响同一组试验的实验结果。

Roff 曾提出决定翅型的阈值模型学说[7]，他认为短、长翅型的遗传基因控制体内 JH 滴度的阈值。根据近年的研究，褐飞虱的翅型是由一对常染色体与一对性染色体支配的多基因型控制的，但即使相同的遗传基因，其对应于环境的表现型具有较大的可塑性[8]。说明褐飞虱的翅型分化既受短、长翅型遗传基因的控制，又受到环境较大的影响，且试验结果表明，褐飞虱短、长翅型雌、雄性别间体内 JH 滴度变化尚有一定差别，这种差别在 3 龄末期就已经显现，说明性别对翅型分化也有一定影响，故有必要对短、长翅型雌、雄虫体内 JH 滴度的阈值及环境对其体内 JH 滴度的影响作进一步研究。

参 考 文 献（References）

[1] 马巨法，唐 健，胡国文等. 稻褐飞虱成虫翅二型现象. 昆虫知识，1995，32（3）：174～178

[2] Iwanaga K，Tojo S. Effects of juvenile hormone and rearing density on wing dimorphism and oocyte development in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. J. Insect physiol.，1986，32（6）：585～590

[3] 杨亦桦，戴华国，韩航如等. 用 HPLC 测定稻褐飞虱体内的保幼激素. 华东昆虫学报，1997，6（2）：24～27

[4] 戴华国，程 薇，吴晓毅等. 稻褐飞虱保幼激素酯酶活性的测定. 南京农业大学学报，1997，20（4）：108～110

[5] 戴华国，吴晓毅，冯从经等. 褐飞虱的交配行为及与保幼激素滴度的关系. 昆虫学报，1997，40（增）：153～158

[6] Nijhout F I，Wheeler D E. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphism. Q. Rer. Biol.，1982，57：109～133

[7] Roff D A. The evolution of wing dimorphism in insects. Evolution，1986，40：1 009～1 020

[8] 藤崎宪治. 昆虫における分散多型性の进化：Roffの理论の检证. 日本应动昆会志，1994，38（4）：231～244

The change of juvenile hormone titer and its relation with wing dimorphism of brown planthopper，*Nilaparvata lugens*

DAI Hua-guo，WU Xiao-yi，WU Shu-wen

（College of Plant Protection，Nanjing Agricultural University，Nanjing 210095，China）

Abstract: The high performance liquid chromatography（HPLC）and radiochemical method were applied to determine the dynamics of juvenile hormone titer and JH esterase activity in the nymphal stages of brown planthopper. The results showed that the JH titers between brachypters and macropters were obviously different in the 4th instar nymphs of both male and female and in the early 5th instar nymph of male. Therefore，these nymphal instars could be considered to be the critical period for wing dimorphism determination，which had been verified with topical application of methoprene（ZR-515）.

Key words: brown planthopper；wing-form determination；JH titer